



試験管内プリオン増幅を応用した変異型クロイツフェルト・ヤコブ病の微量プリオンの検出法開発

著者	横山 多可志
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	11301乙第9219号
URL	http://hdl.handle.net/10097/58316

学 位 論 文 要 約

博士論文題目 試験管内プリオン増幅を応用した変異型クロイツフェルト・ヤコブ病の微量プリオンの
検出法開発

氏名 横山 多可志

背景・目的

プリオン病は致死性の神経変性疾患であり、病原因子は生体に存在するプリオンタンパク質(prion protein: PrP)が異常な状態に変化したプリオンタンパク質(scrapie prion protein: PrP^{Sc})であるとされている。1996年に新たなプリオン病として変異型クロイツフェルト・ヤコブ病(variant Creutzfeldt-Jakob disease: vCJD)が報告され、牛海綿状脳症に含まれるウシの PrP^{Sc} をヒトが摂食したことが病因とされている。近年、輸血や血液製剤、臓器移植による vCJD の 2 次感染が懸念されている。モデル動物の発症前の輸血による感染例や血友病患者の脾臓にプロテアーゼ処理に抵抗性を持つ異常型プリオンタンパク質(protease-resistant prion protein: PrP^{res})が見出されたことから、vCJD 発症前の血液、血漿に PrP^{Sc} が存在すると考えられている。vCJD の 2 次感染を防止するためには vCJD 発症前の生体液に存在すると思われる微量の PrP^{Sc} を検出することが必要であり、本研究では血漿存在下で微量な PrP^{Sc} を検出する系の構築を目指した。

材料・方法

本研究の PrP^{Sc} ソースは vCJD 患者の脳とした。vCJD 脳ホモジネートを希釈し PMCA(Protein Misfolding Cyclic Amplification)法によって PrP^{Sc} を増幅した。PMCA 後 Proteinase K 処理し、ウエスタンブロットによって増幅した PrP^{Sc} を PrP^{res} として検出した。vCJD 脳ホモジネートを高倍率に希釈したサンプルから PMCA 後に PrP^{res} を検出するために、PMCA の条件や添加物を検討した。

結果

ヒト培養細胞を利用した cell-PMCA について pH や塩濃度などの至適条件を検討し、vCJD の PrP^{res} は 1 ラウンドで 10 倍程度増幅したが、硫酸化多糖類であるヘパリンを添加すると増幅率が約 100 倍に向上した。さらに SP Sepharose を加えた cell-PMCAr(cell-PMCA with resin)を血漿存在下で実施すると、増幅率は一千万倍あるいは一億倍に達した。PrP^{res} を高倍率に増幅する cell-PMCAr を 2 ラウンド実施することによって、vCJD 脳 10⁻¹⁰ スパイク血漿の PrP^{Sc} が高い確率で検出可能になった。cell-PMCAr 前の vCJD 脳 10⁻¹⁰ スパイク血漿には PrP^{res} が 60 ag(6×10⁻¹⁷ g)含まれると試算された。ヘパリン、SP Sepharose の効果はプリオン株に依存しており、vCJD 以外のプリオン株では著しい促進作用が見られなかった。

結論

本研究によって構築された cell-PMCAr の検出限界は 60 ag PrP^{res} であることが示された。cell-PMCA はヘパリン、SP Sepharose によって促進されることを見出したが、作用機序は不明である。またヘパリン、SP Sepharose の効果は株特異的であり、cell-PMCAr は vCJD の PrP^{Sc} を特異的に検出する系としての応用が考えられる。

cell-PMCAr の PrP^{res} 検出限界は ag(10⁻¹⁸ g)オーダーであり、これまでの報告から vCJD 患者の血漿から PrP^{Sc} を検出可能であると推測されるが、実際の試料を用いた検証は行っていない。vCJD 血漿の PrP^{Sc} が cell-PMCAr で検出可能であれば、cell-PMCAr は血漿を介した vCJD の 2 次感染を防ぐスクリーニング検査法の候補になると考えられる。